

Állatorvostudományi Egyetem

Zoológiai Tanszék

A DNS transzpozonok funkcionális vizsgálata
emlős sejtekben

Functional characterization of DNA transposons
in mammalian cells

Lávay Petra

Témavezető: Dr. Orbán Tamás, tudományos főmunkatárs
Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet,
Génreguláció Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Szabó Krisztián, tudományos munkatárs
Zoológiai Tanszék

2024

Absztrakt

A DNS transzpozonok olyan mobilis genetikai elemek, melyek kulcsszerepet játszanak számos genomi folyamatban, ideértve a gazdagenomok evolúcióját is. A *piggyBac* transzpozon szupercsalád a DNS transzpozonok egyik fő csoportját alkotja, amelynek tagjait széles körben azonosították különböző organizmusok genomjaiban, és az egyik változata emberi gyógyászatban is növekvő jelentőséggel bír. A transzpozáz enzim funkcionális régióinak többségét részletesen vizsgálták, azonban a fehérje rendelkezik egy 100 aminosavból álló N-terminális rendezetlen doménnel (NTDR), amelynek funkciója jelenleg ismeretlen. Kísérleteim során megállapítottam, hogy az NTDR levágása nem vezetett sem az excízió, sem a transzpozíció megszűnéséhez, tehát ez a régió nélkülözhetőnek tűnik ezekben a folyamatokban. Ezenfelül kimutattam, hogy a fehérje ezen szegmensének cseréje a *piggyBac*-eredetű transzpozáz 2-es (PGBD2) NTDR-rel nem járt teljes transzpozíciós veszteséggel, ezáltal alátámasztottam, hogy a domesztikált PGBD2 NTDR jelenlegi szerepe alig hasonlíthat a *piggyBac* transzpozáz NTDR ősi funkciójához. Ezek az eredmények fényt derítenek a *piggyBac* transzpozon szerkezetének és funkciójának bonyolult kölcsönhatásaira, értékes betekintést nyújtva a hatékonyabb genetikai manipulációs eszközök fejlesztéséhez.

Abstract

DNA transposons are mobile genetic elements that play a key role in many genomic processes, including the evolution of host genomes. The *piggyBac* transposon superfamily is one of the major groups of DNA transposons, its members have been widely identified in the genomes of various organisms, and one of its variants is of increasing importance in human medicine. Most of the functional regions of the transposase enzyme have been studied, however the protein has a 100 amino acid long N-terminal disordered domain (NTDR) with a currently unknown function. In my experiments, I found that the deletion of the NTDR did not lead to a complete loss of neither excision nor transposition, meaning that this region appears to be dispensable for these processes. In addition, I showed that the replacement of the NTDR with the *piggyBac*-derived transposase 2 (PGBD2) NTDR also did not result in a complete loss of transposition, thus substantiating that the current role of the domesticated PGBD2 NTDR bears little resemblance to the ancient function of the *piggyBac* transposase NTDR. These results shed light on the complex interplay between structure and function within the *piggyBac* transposon, providing valuable insight into the development of more efficient genetic manipulation tools.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	6
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A DNS transzpozonok.....	7
2.2. A <i>piggyBac</i> transzpozon szupercsalád	8
2.2.1. A <i>piggyBac</i> transzpozonok domesztikációja a humán genomban	9
2.2.2. A <i>piggyBac</i> transzpozáz N-terminális rendezetlen doménje.....	10
2.2.3. Felhasználás a génmódosításban, emberi gyógyászatban	11
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	13
4. MÓDSZER.....	14
4.1. Emlős sejtekkel való kísérletezés	15
4.2. Excíziós esszé.....	15
4.3. Kolónia esszé.....	19
5. EREDMÉNYEK.....	21
5.1. Excíziós esszék.....	21
5.2. Kolónia esszék.....	22
6. DISZKUSSZIÓ	25
7. ÖSSZEFOGLALÁS	28
IRODALOMJEGYZÉK.....	29
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CAR = Kiméra antigén receptor

CRD = Ciszteinben gazdag domén

CRISPR = Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DDBD = Dimerizációs és DNS-kötő domén

DDD = Katalitikus triádot alkotó aminosavak (3 aszparaginsav) jelölése

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS = Fetal bovine serum

FDA = American Food and Drug Administration

GFP = Zöld fluoreszcens fehérje

HEK-293 = Humán embrionális vesesejtvonal

hyPB = Hiperaktív *piggyBac* transzpozáz

iPS = Indukált pluripotens sejtek

MITE = Miniature inverted-repeat transposable element

mPB = Emlősre kodon-optimalizált *piggyBac* transzpozáz

mPBdel = Deléciós *piggyBac* mutáns transzpozáz

mPBmut = Katalitikusan inaktív *piggyBac* mutáns transzpozáz

mPB-PGBD2 = PGBD2-es N-terminális régiójával fuzionált *piggyBac* mutáns transzpozáz

NTDR = N-terminális rendezetlen domén

PB = *PiggyBac*

PBS = Phosphate-buffered saline

PCR = Polimeráz-láncreakció

PGBD = *PiggyBac* transposon-derived element

SDS = Sodium dodecyl sulfate

SB = *Sleeping Beauty*

TIR = Terminal inverted repeat

1. BEVEZETÉS

A transzpozonok mobilis genetikai elemek, amelyek képesek áthelyeződni egyik DNS lókusztól a másikra, akár különféle eredetű genomok között is.

Ezt tehetik RNS intermedierek segítségével, amely során a donor szekvenciáról egy RNS köztes termék szintetizálódik, majd a reverz transzkripció során létrejött DNS beépül a cél szekvenciába („Retrotranszpozonok”). Az alternatív útvonal, amikor közvetlenül DNS intermedierek keresztül történik a transzpozíció, anélkül, hogy RNS köztes termékek keletkeznének. Ilyenkor a transzpozáz enzim közvetlenül vágja ki és másolja be a DNS szakaszokat egy új lókusztúra („DNS transzpozonok”) [1].

Sokáig egyszerűen önző génekként, vagy a genom parazitáiként voltak elkönyvelve, mivel mutációkkal, duplikációkkal, gének aktiválásával vagy inaktiválásával, replikációjuk során képesek átalakítani a gazdaszervezet genomját [2]. Az utóbbi évek kutatásai során azonban világossá vált, hogy a gazdaszervezet számára a transzpozonok felhalmozódása nem csak káros lehet, mint ahogyan bármely mutációs folyamat, hanem meghatározó szerepet játszanak például a prokarióta és az eukarióta genomok molekuláris evolúciójában [3]. Ennek eklatáns példája, amikor bakteriális populációk között, a horizontális géntranszfer során, elősegítik az antibiotikum rezisztencia gének terjedését [4]. Továbbá, a humán genom esetében szerepet játszhatnak az őssejtek jellemzőinek regulációjában, vagy a stressztűrés és az öregedés szabályozásában [5].

További érdekes jelenség, hogy a genom és a transzpozonok koevolúciója során, egyes mobilis elemek végig mehettek a genomi domesztikáció folyamatán, vagyis a transzpozíció elvesztése mellett a gazdaszervezet számára hasznos endogén funkciókat láthatnak el [6].

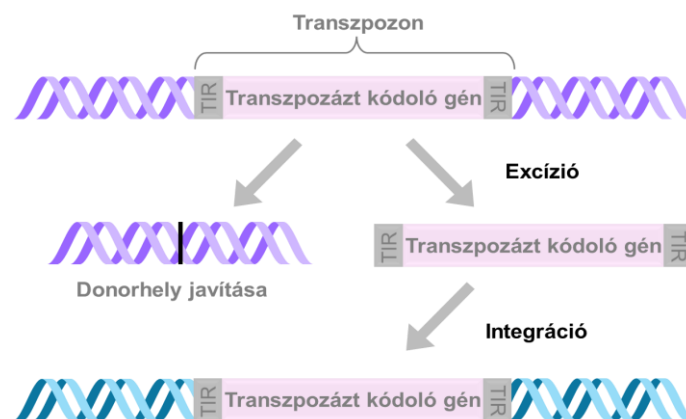
A genomokra gyakorolt biológiai hatásuk mellett, a transzpozonokat genetikai vektorként használják az alap kutatásban és a transzgenézisben. Emellett hatékony eszköznek bizonyulnak a génterápiás fejlesztések során is, így jelentős előrelépéseket ígérnek az orvostudomány területén [7].

Szakedolgozatom keretében, az DNS transzpozonok csoportjába tartozó, rovar eredetű *piggyBac* (PB) transzpozáz enzim N-terminális rendezetlen doménjének (NTDR) az excíziós és transzpozíciós mechanizmusát, és az ezekben betöltött szerepét vizsgáltam.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A DNS transzpozonok

A DNS transzpozonok, vagy másnéven „Class II” transzpozonok mobilizációjuk során kizárólag DNS intermediert használnak. Transzpozíciójuk során úgynevezett „cut-and-paste” mechanizmussal mozognak, vagyis van egy excíziós és egy integrációs lépés. Ez a folyamat a kódolt transzpozáz enzímük révén megy végbe: a transzpozáz felismeri a Terminális Inverted Repeat-eket (TIR), kivágja a transzpozont a donorhelyről, és egy tetszőleges célhelyre integrálja [8] (1. ábra).



1. ábra: A DNS transzpozonok excíziós és integrációs lépéseinek sematikus ábrája [7].

Rövidítés: TIR = terminális inverted repeat

A DNS transzpozonok körébe való sorolás azonban nem mindig egyértelmű, hiszen léteznek olyan DNS transzpozonok, melyek nem az említett „cut-and-paste” mechanizmussal mozognak, hanem a retrotranszpozonokra emlékeztető, „copy-and-paste” mechanizmussal (például az úgynevezett Helitronok). Továbbá, léteznek úgynevezett Miniature Inverted Repeat Transposable Element-ek (MITE) is, melyek nagymértékben redukált, kódoló kapacitás nélküli szekvenciák [9]. Mindemelett, egy másik csoportosítási szempont alapján tovább lehet osztani a transzpozonokat autonóm és nem-autonóm mobilis elemekre. Az autonóm elemek kódolják a mobilizációjukhoz szükséges enzimeket, míg a nem-autonóm elemek transzpozíciójukhoz más, autonóm transzpozonok enzimatikus folyamataira támaszkodnak [10].

A transzpozonokat Barbara McClintock fedezte fel, aki elsőként egy olyan autonóm DNS transzpozont írt le, amely felelős a *Zea Mays*, azaz a kukoricamag mozaik színmintáinak változatosságáért [11, 12]. Ez az azonosítás és dokumentálás jelentős mérföldkönek számít a genetikában és a molekuláris biológiában.

Azóta kiderült, hogy nem csak a kukorica genomjában találhatóak ilyen elemek, sőt egyes feltételezések szerint a természetben nagyobb számban vannak jelen a „transzpozázokat kódoló” gének, mint a „nélkülözhetetlen, háztartási” gének [13].

Transzpozonokat majdnem minden szervezetben azonosítottak, illetve egy faj genomjának akár nagy részét is elfoglalhatják, de elterjedésük nem követ egyértelmű filogenetikai mintázatot. A transzpozábilis elemek a *Mus musculus* genomjának 32%-át, *Danio rerio* 55%-át [14], egyes növényeknek, például a kukorica genomjának 80%-át is kitehetik [15]. Annotálástól függően, a humán genom 42,8%-ától [16] akár 69%-a [17] is transzpozábilis elem lehet.

Ugyanez a heterogén filogenetikai mintázat figyelhető meg a DNS transzpozonok arányaiban is. A valódi csontshalaknál és a karmosbékáknál a DNS transzpozonok a dominánsak, míg az emlős vonalon a retrotranszpozonok [14]. Így a humán genomban is relatívan kevés a DNS transzpozon arány.

2.2. A *piggyBac* transzpozon szupercsalád

40 évvel Barbara McClintock felfedezése után, leírtak egy eredetileg IFP2-nek elnevezett autonóm, aktív, DNS transzpozont [18], ami később a *piggyBac* transzpozon szupercsaládnak első tagjaként lett elkönyvelve [19]. Ez a rovar eredetű transzpozon eredetileg egy mutáns, *Baculoviridae* családba tartozó vírusból izolálták, amellyel egy U-betűs aranybagoly (*Trichoplusia ni*) sejttenyészetet fertőztek meg [20]. Ez manapság a PB transzpozonokkal való kísérletezés alapját szolgálja. Felfedezésekor azt hitték, hogy csak az *Insecta* osztályon belül képes transzpozícióra [21, 22]. Azonban amikor reaktiválták a *Sleeping Beauty* (SB) nevezetű transzpozont, és transzpozon-alapú technológiákat kezdtek emlős genomokban fejleszteni [23], a PB transzpozonokat is elkezdték mélyebben kutatni. 2000-ben megtalálták a második PB szupercsaládba tartozó transzpozont [24], majd 2005-ben rájöttek, hogy a rovar eredetű PB emlős sejtekben is képes transzpozícióra [25]. Ezzel egy teljesen új világ nyílt meg a génbeviteli eljárások és a genetikai manipuláció terén. Érdekes módon azóta azt is feltételezik, hogy a *Tetrapoda* főosztályon belül a PB-ek többször is horizontális géntranszfer során kerültek átadásra [14].

A PB transzpozonok különlegessége abban rejlik, hogy DNS lábnyom („footprint”) nélküli, pontos hasítást hajtanak végre, így a hátrahagyott donor szekvenciák javításához további DNS szintézisre nincs szükség [26]. Ezenkívül, célspecifikus hasítást végeznek; az

excízió és integráció 'TTAA' szekvenciák mentén zajlik. Ezek olyan előnyös tulajdonságok, amelyeket a genetikai módosítások során ki lehet használni (lásd 2.2.3. fejezet).

2.2.1. A *piggyBac* transzpozonok domesztikációja a humán genomban

Ahogy korábban szóba került, a transzpozonok mutagén aktivitása kétélű kard. Ugyanakkor figyelemre méltó, hogy *piggyBac*-eredetű szekvenciákat sokféle organizmus genomjában találtak, gombáktól és növényektől egészen az emlősökig terjedően. Ezen szekvenciák egy része molekuláris domesztikáció jeleit mutatja [27]. A kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy különböző evolúciós vonalakon, egymástól függetlenül, többször is történt domesztikáció. Ez a jelenség arra utal, hogy a transzpozonok nem csupán önző gének, hanem a transzpozíciós képesség elvesztését követően, endogén funkciókra szelektálódva képesek hozzájárulni a gazda genom evolúciójához [28].

A domesztikált transzpozonok általános jellemzői, hogy elvesztették mobilizációs képességüket úgy, hogy a transzpozícióhoz szükséges szekvenciák általában nem funkcionálisak, vagy teljesen hiányoznak [29]. Emellett, míg a klasszikus transzpozonok több példányban és különböző pozíciókban találhatóak divergens fajok genomjában, a domesztikált transzpozonok általában egyetlen ortológ kópiában találhatóak, különböző fajokban is [30]. Az ilyen domesztikált elemek általában gazdagénekként funkcionálnak; egyes funkcionális jellemzőit a transzpozonnak a gazda szervezet kihasználja, és mostanra már specifikus sejtszintű feladatokat látnak el [28].

Számos példa van olyan gazdagénekre, amelyek transzpozázokból származnak [31–33]. A kutatók számára a legnagyobb érdeklődést viszont a humán genomban lévő domesztikált transzpozon-eredetű szekvenciák váltották ki [34–36].

Öt darab *piggyBac* transzpozáz-eredetű szekvencia található meg az emberi genomban (*piggyBac* transposon-derived element, PGBD1-5) [37], melyek valamilyen domesztikált funkcióval rendelkeznek. Eme funkciók jelenleg még nem pontosan ismertek, bár néhány endogén szerepkört a közelmúltban már publikáltak [38, 39]. A PGBD-k jellemzői, hogy inaktívak, vagyis nem képesek transzpozícióra [40–42]. Néhány kutató szerint az úgynevezett PGBD5 képes lehet transzpozícióra [43–45], ez azonban jelenleg még vitatott tény, ennek tisztázásához további kutatások szükségesek.

A PGBD2 nevű transzpozáz kódozó génről nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre. Tudjuk, hogy ez egy méhlepényes emlősökre jellemző [28], sokféle szövetben expresszálódó PGBD [38]. Azonban az elmúlt két évben jelentek meg olyan publikációk, hogy ennek hiánya esetleg egy genetikai faktor lehet a veleszületett

rekeszsérvnek [46], szerepet játszhat a trombociták aktiválásban [47], vagy akár lehetséges biomarkerként is szolgálhat a miópia nevezetű látászavarban [48].

Ezért kiemelten fontos lenne minél többet megtudni arról, hogyan kapcsolódik egymáshoz a szerkezet és a funkció ezen transzpozázok esetében, ami a *piggyBac* szuperfamilia tartozó transzpozonok molekuláris mechanizmusának pontosabb megértése mellett hozzájárulhat a domesztikált fehérjék szerepének pontosabb megértéséhez is.

2.2.2. A *piggyBac* transzpozáz N-terminális rendezetlen doménje

A PB transzpozáz enzim 594 aminosav hosszú, és több doménre osztható [49] (2. ábra). Azonosítottak a fehérje C-terminális végén egy ciszteinben gazdag domént (CRD), mely tartalmaz egy nukleáris lokalizációs szignált, ami segíti a fehérjét a sejtmagba történő bejutásban [50]. A fehérje középső régiójában helyezkedik el a katalitikus domén, mely tartalmazza a katalitikus triádot alkotó három aszparaginsavat (DDD) (268, 346 és 447 pozíciókban). Ez a katalitikus triád felelős a DNS hasítás és összekapcsolódási reakciók katalizálásáért [51]. A katalitikus domén mindkét oldalát a Dimerizációs és DNS-kötő domén (DDBD) határolja. Ez a domén felelős a TIR-ekkel való interakcióért, valamint a célhely DNS-ével való kapcsolódásáért is [49].



2. ábra: A *piggyBac* transzpozáz enzim doménjeinek sematikus ábrája [52].

Rövidítések: NTDR: N-terminális rendezetlen régió; DDBD: Dimerizációs és DNS-kötő domén, CRD: C-terminális ciszteinben gazdag domén.

Ellentétben az eddig felsorolt fehérje doménekkal, a *piggyBac* transzpozáz NTDR régiójáról szóló ismereteink még mindig korlátozottak. Jelen pillanatig a kutatók azt állapították meg, hogy mintegy 100 aminosav hosszú, és savas jellegű, vagyis magas a savas aminosavak aránya benne [52]. Ezenkívül kiemelt jelentősége van annak, hogy erősen rendezetlen szerkezettel rendelkezik [49], vagyis az aminosav lánc többféle harmadlagos szerkezettel rendelkezhet. Mivel az ilyen rendezetlen régiók ellentmondanak a fehérjék „hagyományos” szerkezet-funkció paradigmájának [53], így kiemelt figyelmet igényel az NTDR funkciójának részletesebb megértése.

2.2.3. Felhasználás a génmódosításban, emberi gyógyászatban

A DNS transzpozonok kutatása nemcsak az alapvető genetikai folyamatok megértését szolgálja, hanem számos klinikai alkalmazási lehetőséget is kínál.

A genetikai kutatásokban alkalmazott mutagenézisen alapuló vizsgálatok mellett a DNS transzpozonokat elsősorban génbeviteli eljárásokban, illetve az emberi gyógyászatban géninszerciós vektorrendszerekként használják. Fontos tény, hogy egyre jobban átveszik a vírusvektorok szerepét, mivel a vírusvektorok előállításuk költséges és időigényes, a virális integráció szekvencia preferenciája miatt, a vírusok onkogén hatásúak lehetnek, valamint az immunválaszok a vírusok vagy vírusos töredékek ellen bonyolíthatják használatukat [54, 55].

A PB transzpozonok előnyös alternatívát jelentenek a génterápiás eljárásokban, mert kedvezőbb integrációs profillal jellemezhetők, DNS lábnyom nélkül hasítanak és non-random integrációs preferenciát mutatnak a transzkripció kezdőhelyek és a hosszú 'TTAA' ismétlődések felé [26, 56]. Továbbá, a szintén széleskörben használt SB transzpozonokkal szemben, nagyobb a kargo kapacitásuk és több transzgént is képesek egyidejűleg szállítani és ko-expresszálni [57].

A PB transzpozonok további előnye a könnyű alakíthatóságuk. Több variánst is kifejlesztettek, például a hiperaktív PB mutánst (hyPB), amely jelentősen meghaladja a vad típusú variáns hatékonyságát [58]. Egy másik változat pedig, a kizárólag excízióra képes mutáns, amelynek kifejlesztése lehetővé tette a transzpozon-alapú átmeneti transzgenézist, melyet arra lehet használni, hogy indukált pluripotens sejteket (iPS) hozzon létre, majd eltávolítsa a visszaprogramozó faktorokat, ezáltal meggátolva a későbbi reaktivációt és az onkogén transzformációt [59]. Ez jelentős előrelépést jelentett az iPS transzplantációs eljárások alkalmazási lehetőségeiben.

Nemrégiben a génmanipuláció terén a CRISPR-Cas9 rendszer vált népszerűvé [60, 61], azonban miután kiderültek a korlátai, a kutatók a DNS transzpozonok felé is fordultak a problémák megoldásához. Egy transzpozon-RNS célpontozó rendszerrel például, meg lehetne szüntetni a cél DNS-ben lévő kettős szálú töréseket, a donor DNS-en lévő homológ karok szükségét és a gazda sejt DNS javító rendszereire való támaszkodást [62]. Illetve, egy olyan „prime-editing” módszerrel, mely CRISPR-*piggyBac* rendszert használ, hatékonyan dolgozhatunk olyan sejt vonalakon, amelyek esetében jelenleg még nincsenek kidolgozva optimális transzfekeciós protokollok [63].

A jelenlegi génterápiás eljárások közül a legrelevánsabb felhasználása a kiméra antigén receptorokkal (CAR) ellátott, PB transzpozonok segítségével átprogramozott T-sejtek. A receptorok kimerikusak abban az értelemben, hogy egyetlen receptorban

kombinálják az antigénhez kötődő és a T-sejteket aktiváló funkciókat, így új képességet adnak a T-sejteknek egy specifikus antigén célzására [64].

A CAR T-sejt terápia során a T-sejteket a betegből gyűjtik be, genetikailag módosítják őket, majd a CAR T-sejteket visszainjektálják a betegbe úgy, hogy a sejtek képesek legyenek felismerni a ráksejteket, és elpusztítani azokat. Ezáltal gyakorlatilag „megtanítják” az immunrendszert, hogy felismerje és megtámadja a daganatokat, főleg a nehezen elérhetőeket vagy a rezisztenseket [65].

Több, az FDA (American Food and Drug Administration) által jóváhagyott CAR T-sejtes genetikai módosítás már elérhető [66]. Azonban ezen módszerek többségénél jelenleg retrovirális vektorokat alkalmaznak, noha a transzpozonok vonzóbb alternatívának bizonyulnak. Ezek nemcsak biztonságosabbak, hanem költséghatékonyabbak is, így szélesebb körben elérhetővé válnának a terápiák [67].

Az elmúlt években több kutatás is elindult a *piggyBac* CAR-T sejt terápiák terén. Ezek közül sok vizsgálat már a humán klinikai fázisok egyikében tart, többségük az 1., néhány a 2.-3. fázisban [68–73]. Ezért fontos tovább vizsgálni és finomítani ezeket a rendszereket annak érdekében, hogy maximalizálják hatékonyságukat és biztonságukat a jövőbeni klinikai alkalmazások során.

A *piggyBac* szuperfamilia mérete, a humán genomban található domesztikált szekvenciák, valamint az emberi gyógyászatban való széles körű alkalmazása mind olyan tényezők, amelyek alapján komoly igény van arra, hogy alaposabb vizsgálatokat végezzenek ezen a nyilvánvalóan releváns fehérjecsaldón.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A transzpozonok génterápiás célú felhasználásának előfeltétele a transzpozáz fehérje szerkezetének és funkciójának pontosabb leírása, különös tekintettel a kevésbé karakterizált PB NTDR szegmensre. A dolgozat alapját képező kutatómunka során célom a rovar eredetű *piggyBac* transzpozáz fehérje N-terminális rendezetlen régiójának funkcionális vizsgálata volt.

Előzetes eredmények alapján sejthető volt, hogy a transzpozázt negatívan befolyásolja az NTDR deléciója, így arra voltam kíváncsi, hogy más transzpozázok NTDR szekvenciáival helyettesített rovar eredetű fehérjékben helyreáll-e az eredeti transzpozíciós aktivitás. Ehhez a kevésbé kutatott PGBD2-es humán transzpozáz NTDR régióját választottam.

A kutatásomnak kérdései tehát, hogy képes-e excízióra a *piggyBac* transzpozáz...

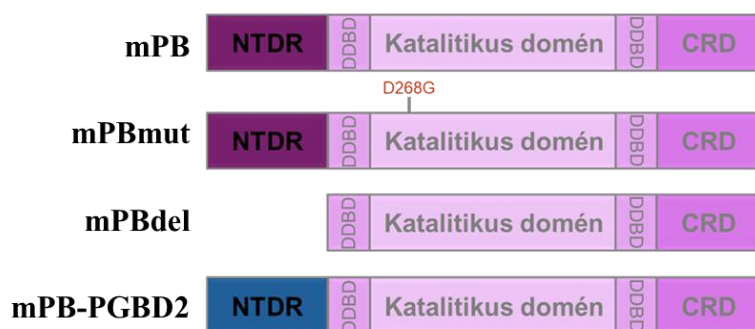
- az NTDR eltávolítása után?
- a PGBD2 NTDR szekvenciájára való cserélése után?

Ha igen, akkor van-e kimutatható transzpozíciója...

- az NTDR deléciós mutánsnak?
- a PGBD2 NTDR szekvenciáját tartalmazó mutánsnak?

4. MÓDSZER

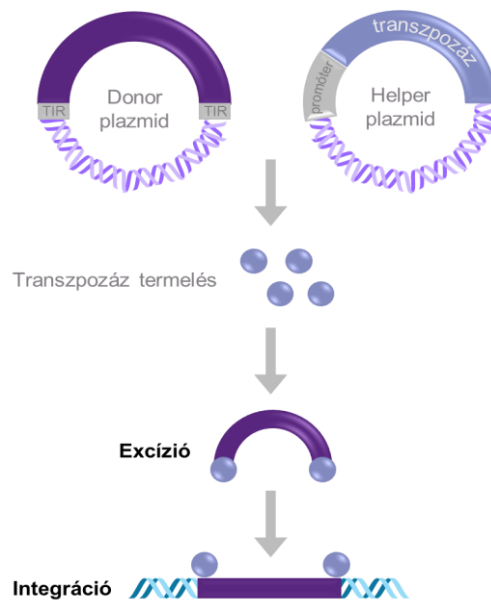
Transzpozíciós kísérleteim során négyféle PB transzpozáz alkalmaztam. Pozitív kontrollként az emlős kodon-optimalizált, aktív PB transzpozáz (mPB) szolgált [74]. Negatív kontrollként az mPB katalitikusan inaktivált mutánsa szolgált (mPBmut), amelyben a DDD első aszparaginsav tagja, glicinre lett cserélve [38]. A harmadik típusú transzpozáz egy deléciós variáns jelentette, ahol az mPB N-terminális végéről, 3-100 pozíciókban lévő aminosavak el lettek távolítva (mPBdel). Vizsgáltam továbbá egy olyan mutánst, ahol az mPBdel transzpozáz variáns rendezetlen szekvenciáját helyettesítve, a humán PGBD2 NTDR szegmens lett illesztve (mPB-PGBD2) (3. ábra).



3. ábra: Az NTDR vizsgálatára használt *piggyBac* transzpozáz variánsok sematikus ábrája.

Rövidítések: mPB = emlősre kodon-optimalizált *piggyBac*, mPBmut = inaktivált *piggyBac* mutáns, mPBdel = deléciós *piggyBac* mutáns, mPB-PGBD2 = PGBD2-es részével fuzionált *piggyBac* mutáns.

Kísérleteimnek alapját a donor plazmidon lévő PB transzpozon egység szolgálta, mely vagy egy CAG promóter által hajtott GFP (zöld fluoreszcens fehérje) gént hordozott (PB-GFP) (excíziós esszék), vagy egy PGK promóter által vezérelt puromycin rezisztencia gént (PB-GFP-Puro) (kolónia esszék). A donor plazmid mellé kotranszfektált helper plazmid, CMV promóter által meghajtott PB transzpozáz variánsokat tartalmazott. A folyamat tehát alapesetben úgy ment végbe, hogy a kotranszfekciót követően a helper plazmidon lévő transzpozáz, amennyiben képes volt rá, felismerte a donor plazmidon lévő PB transzpozon kazettát, és megtörtént az excíziós és az integrációs lépés (4. ábra).



4. ábra: A transzpozíciós esszék során transzfectált *piggyBac* transzpozáz működési folyamatának sematikus ábrája.

4.1. Emlős sejtekkel való kísérletezés

A tesztek elvégzése érdekében szükséges volt a HEK-293 sejtek (humán embrionális vesesejtvonal) fenntartására és heti kétszeres passzálására. A sejtek 37°C-os, 5% CO₂-tartalmú inkubátorban voltak fenntartva, 10% hőinaktivált FBS szérummal (Fetal bovine serum), 1% L-glutaminnal és 1% penicillin-streptomycin antibiotikummal kiegészített DMEM tápoldatban (Gibco Dulbecco's modified Eagle's medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok).

Passzálás során a 10ml PBS-sel (Phosphate-buffered saline) átmosott sejteket, 1ml tripszinnel (Gibco TrypLE Express, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) szedtem fel a sejtflaska aljáról, egymástól szétválasztva. Mikroszkópban való ellenőrzés után, a sejtuszpenzióknak csak 10%-át helyeztem vissza a flaskába, 14ml komplettált médiumba (kiegészített DMEM).

4.2. Excíziós esszé

A transzpozáz excíziójának működését excíziós esszével vizsgáltam [75].

Első lépésként a szükséges plazmidokat *Escherichia coli* kompetens sejtekbe kellett transzformálni. Ezt követően, 48 óra elteltével, a QIAprep Spin Miniprep Kit-el (QIAGEN, Hilden, Németország) a gyártói protokoll szerint a felszaporított plazmidokat izoláltam.

NanoDrop 2000c spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) koncentrációt mértem, és megfelelő plazmid térképet használva, megfelelő restrikciós endonukleázokkal a plazmidokat ellenőriztem.

Ezt követően, 10µl HEK-293 sejtszuszpenziót megfestettem trypan kék festékkel (0,40%) (BioRad, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok). A megfestett sejteket ezután egy TC20 automatizált sejtszámlálóval (BioRad, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) számoltam meg. A HEK-293 sejtszuszpenzióból, majd 6 lyukú szövettenyésztő lemezekre helyeztem ki úgy, hogy minden lyukba körülbelül 5×10^5 darab sejt jusson.

24 óra elteltével, a HEK-293 sejtekbe kémiai módon kotranszfectáltam az ellenőrzött plazmidokat (1. táblázat), FuGENE 6 reagens (Promega, Madison, WI, Amerikai Egyesült Államok) és KnockOut DMEM (Gibco KO DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A kotranszfectációhoz 500-500ng donor és helper plazmidot használtam.

1. táblázat: Az excíziós esszék során kotranszfectált donor és helper plazmidok, táblázatba foglalva.

Rövidítések: PB-GFP = a donor plazmid, mely egy PB transzpozon szekvenciát hordoz, amin megtalálható egy GFP-t expresszáló kazetta, mPB, mPBmut, mPBdel, mPB-PGBD2 = *piggyBac* transzpozáz variánsok.

	Donor plazmid	Helper plazmid
1.	PB-GFP	mPB transzpozáz
2.	PB-GFP	mPBmut transzpozáz
3.	PB-GFP	mPBdel transzpozáz
4.	PB-GFP	mPB-PGBD2 transzpozáz

A transzfectió hatékonyságát a sikeresen transzfectált GFP-t expresszáló plazmidokat tartalmazó sejtek arányával lehetett megbecsülni, fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Ezt követően, az eppendorf csövekbe gyűjtött sejtekből QIAprep Spin Miniprep Kit-el (QIAGEN, Hilden, Németország) a gyártó utasítás alapján, 300µl 1,2%-os SDS (Sodium dodecyl sulfate) és 5µl Proteináz K-val kiegészítve, a plazmidokat izoláltam, és a koncentrációkat NanoDrop 2000c spektrofotométer készülék segítségével határoztam meg.

Az izolált mintákból kétkörös nested PCR reakcióval állapítottam meg, hogy történt-e excíziós esemény. Aktív transzpozáz esetében, a donor plazmidon lévő transzpozont a transzpozáz felismerte, kivágta és az emellett lévő szekvenciákat összeillesztette. Így a PCR termék detektálhatóvá vált. Inaktív transzpozáz esetében az excízió nem ment végbe, így a PCR termék nem volt detektálható, az amplicon nagy mérete miatt.

A PCR reakciókhoz a ThermoFisher Scientific™ PCR Master Mix 2X (2xMM) (Waltham, Amerikai Egyesült Államok) termékét használtam. Ez tartalmazta a megfelelő polimeráz enzimet, MgCl₂-ot, dNTP-t, puffert, valamint a loading dye-t is, amely lehetővé tette a futtatás folyamatának követését a gélelektroforézis során. Ehhez a mix-hez adtam a primereket (2. táblázat), az izolált DNS-t, és egészítettem ki a végtérfogatot steril vízzel.

2. táblázat: A PCR reakciókhoz használt primerek és szekvenciái.

Excíziós primerek	Szekvenciák
1. kör forward	5'-GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
1. kör reverz	5'- TCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTC
2. kör forward	5'- CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG
2. kör reverz	5'- CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCG
Amp forward	5'- TTTGCTCACCCAGAAACGC
Amp reverz	5'- AGTTGGCCGCAGTGTTATCAC

Az első kör PCR reakciónak a végtérfogata 20µl volt, míg a második köré 50µl (3. táblázat). A 4. táblázatban látható programot használtam mindkét esetben.

3. táblázat: A kétkörös PCR reakciókhoz használt reakcióelegy pontos mennyiségei.

	1. kör	2. kör
2xMM	10µl	25µl
Forward primer	1µl	2,5µl
Reverz primer	1µl	2,5µl
Hígított DNS	1µl	5µl
H₂O	7µl	15µl
Összesen	20µl	50µl

4. táblázat: A kétkörös PCR reakciók folyamán használt program lépései.

Denaturálás	95°C	5 perc	35 ciklus
Denaturálás	95°C	30 mp	
Primer-kötés	60°C	15 mp	
Polimerizáció	72°C	1 perc	
Polimerizáció	72°C	5 perc	

Emellett, vizsgálati kontrollként, vagyis a plazmidok ellenőrzésére, az összes plazmidon jelenlevő ampicillin szekvenciára specifikus kontroll PCR reakciót is futtattam (5., 6. táblázat).

5. táblázat: Az ampicillin szekvenciákra futatott kontroll PCR reakciókhoz használt elegy pontos mennyiségei.

	Amp
2xMM	12,5µl
Forward primer	1µl
Reverz primer	1µl
DNS	1µl
H₂O	9,5µl
Összesen	25µl

6. táblázat: Az ampicillin szekvenciákra futatott kontroll PCR reakciók folyamán használt program lépései.

Denaturálás	95°C	3 perc	35 ciklus
Denaturálás	95°C	30 mp	
Primer-kötés	59°C	30 mp	
Polimerizáció	72°C	45 mp	
Polimerizáció	72°C	5 perc	

A második kör PCR termékeit, és az ezekhez tartozó ampicillin kontroll termékeket, 1%-os agaróz gélen (1g agaróz, 100ml TBE pufferben feloldva) választottam el, etídium-bromid festéssel tettem láthatóvá, és a Universal Hood Gel Imager Model #75S (BioRad, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) gél dokumentációs rendszerrel fényképeztem.

4.3. Kolónia esszé

A transzpozíciós képesség vizsgálatára kolónia esszét használtam, 2 biológiai párhuzamost készítve [56].

A lépések hasonlítanak az excíziós esszé (lásd 4.2. fejezet) lépeseihez, azonban a donor plazmidon nem csak a transzfekeciós sikeresség mértékének becslését segítő GFP található, hanem egy puromycin rezisztencia gén is (7. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a kísérletsorozat folyamán, a PB transzpozáz variáns, amennyiben képes rá, felismeri, kivágja és beilleszti a donor plazmidon lévő, puromycin rezisztencia gént is hordozó transzpozon kazettát a HEK-293 sejt genomjába. Ennek eredményeképpen az adott sejt rezisztens lesz a puromycin antibiotikumra. Ha a transzpozáz nem képes erre a folyamatra, vagy egyes lépéseire, az adott sejt érzékeny marad a puromycinre.

7. táblázat: A kolónia esszék során kotranszfekektált donor és helper plazmidok, táblázatba foglalva.

Rövidítések: PB-GFP-Puro = a donor plazmid, mely a GFP kazetta mellett, egy puromycin rezisztencia gént is hordoz, mPB, mPBmut, mPBdel, mPB-PGBD2 = *piggyBac* transzpozáz variánsok.

	Donor plazmid	Helper plazmid
1.	PB-GFP-Puro	mPB transzpozáz
2.	PB-GFP-Puro	mPBmut transzpozáz
3.	PB-GFP-Puro	mPBdel transzpozáz
4.	PB-GFP-Puro	mPB-PGBD2 transzpozáz

Az excíziós esszé lépeseitől még oly módon is eltér ez a kísérlet, hogy a kotranszfekeciók és a transzfekeciós hatékonyságok megbecsülése után, az eppendorf csövekbe gyűjtött sejtekből további szelekcióra 20µl-t sejttenyésztő edényekbe helyeztem, 1µg/ml-es koncentrációjú puromycin (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, Amerikai Egyesült Államok) hozzáadásával.

Két-három hétig tartó antibiotikum szelekciót követően, a sejtekről eltávolítottam a médiumot és 5ml, 4°C metanollal fixáltam. Öt perc inkubációs idő után, 5ml kristályibolya festékkel (Crystal Violet, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, Amerikai Egyesült Államok) megfestettem a gyártó utasításainak megfelelően, majd desztillált vízzel átmostam és szobahőmérsékleten megszárazítottam.

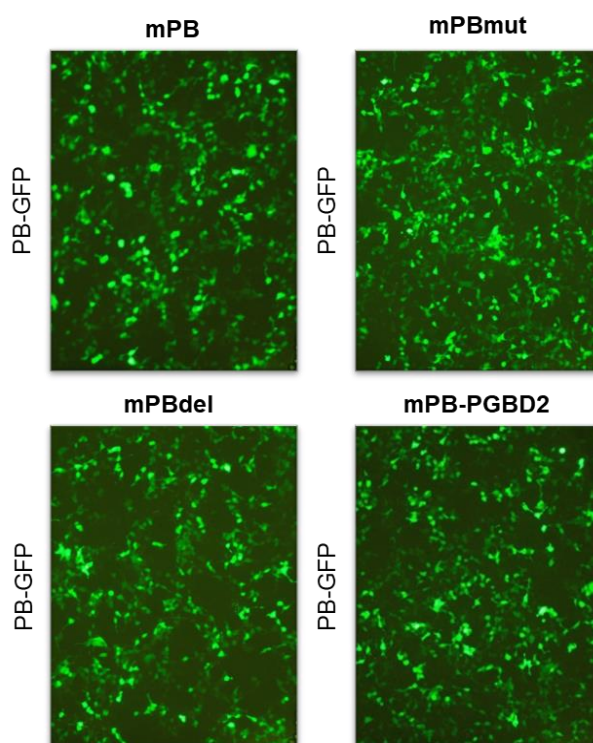
Ezután, a Universal Hood Gel Imager Model #75S rendszerrel az edényeket lefényképeztem, és a Quantity One 4.4.0 program használatával a kolóniákat megszámláltam, így megbecsülve a sejtek számát, amelyekben az excízió és az integráció is megtörtént. Az értékelés során, a párhuzamos reakciók esetén, az adatok átlagát és a szórás (SD) értékeket ábrázoltam.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Excíziós esszék

Az excíziós esszékkel a transzpozáz variánsok excíziós képességét lehetett mérni.

Ellenőrzésképpen, megnéztem a sikeresen transzfectált plazmidok arányát a HEK-293 sejtekben. Fluoreszcens mikroszkóp segítségével, kék fényvel megvilágítva a sejteket, a zölden fluoreszkáló sejtek száma alapján megbecsültem a transzfectációs sikerességet. A protokoll korábbi sikeres alkalmazása alapján ebben a kísérletben 60-70%-os sikerességi rátát vártam, amely minden transzpozáz variáns esetében bekövetkezett (5. ábra).



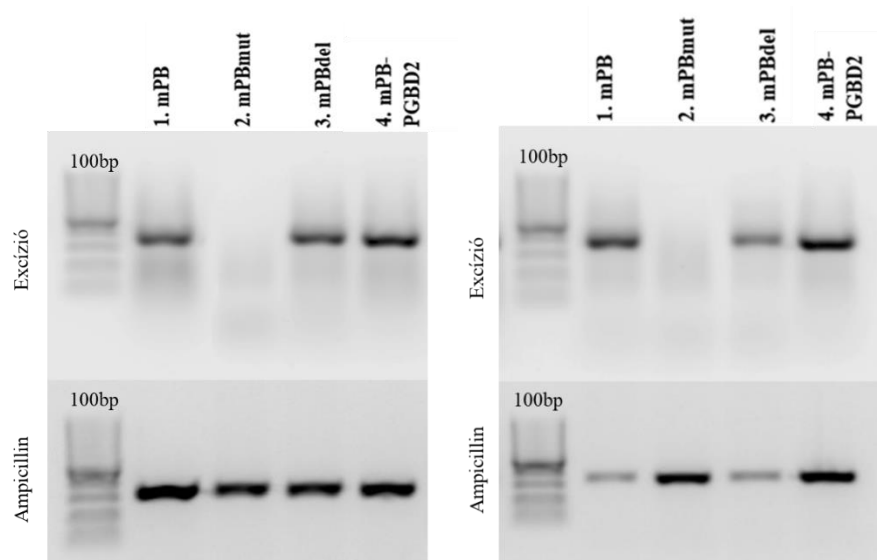
5. ábra: GFP-t expresszáló HEK-293 sejtek. Azokban a sejtekben, amelyekbe sikeresen bejutott a GFP-t hordozó plazmid, zöld fluoreszcenciát fogok észlelni. A zölden fluoreszkáló és a nem fluoreszkáló sejtek aránya alapján a transzfectációs hatékonyság megbecsülhető.

Rövidítések: PB-GFP = a donor plazmid, mely egy PB transzpozon szekvenciát hordoz, amin megtalálható egy GFP-t expresszáló kazetta, mPB = emlősre kodon-optimalizált *piggyBac*, mPBmut = inaktivált *piggyBac* mutáns, mPBdel = deléciós *piggyBac* mutáns, mPB-PGBD2 = PGBD2-es részével fuzionált *piggyBac* mutáns.

A sejtekből izolált plazmidokon elvégzett nem-kvantitatív, „diagnosztikus” PCR alkalmazásával egy igen/nem válaszként, meg tudtam állapítani, hogy gátolja-e az excíziót a transzpozáz NTDR-jének deléciója, illetve cseréje (6. ábra). A gélelektroforézis digitális képén, a 381 bázispáros felső termék (Excízió) a donor plazmidokról származik, ahol

megtörtént a kivágás és a javítás. A 340 bázispáros, alsó termék (Ampicillin) a transzfectált plazmidokon található ampicillin rezisztencia gén jelenlétét mutatja, amelyet kísérleti kontrollként használtam.

Látható, hogy az mPB-nél, mint pozitív kontrollnál, van excízió, a negatív kontrollnál, az mPBmut-nál nincs, az mPBdel-nél, valamint az mPB-PGBD2-nél szintén van excízió.



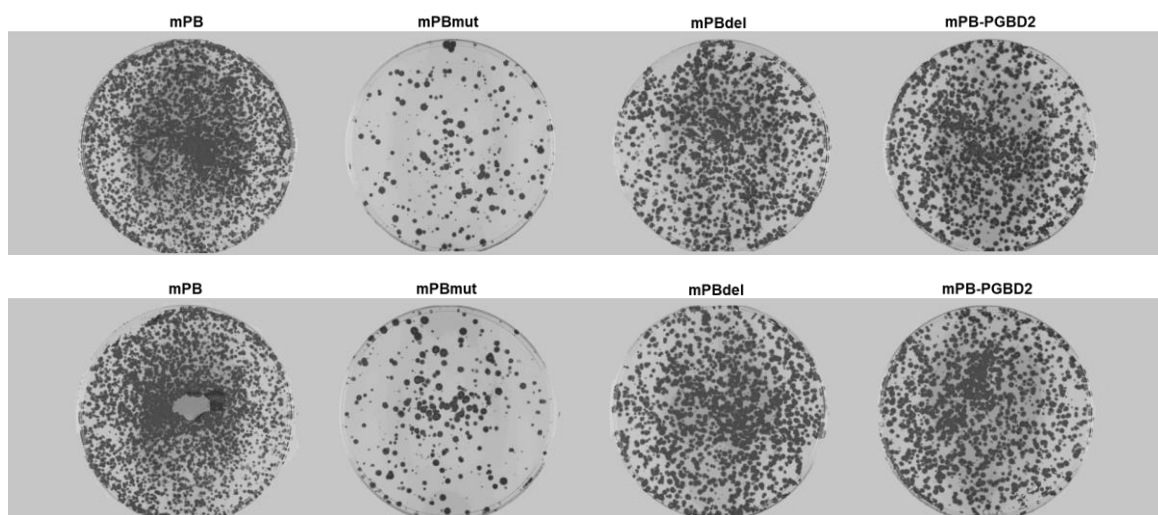
6. ábra: Az excíziós esszék két független reprezentatív eredménye. Az excízió minden *piggyBac* transzpozáz variáns esetében végbement, a negatív kontrollként használt inaktív mutáns kivételével.

Rövidítések: 100bp = Száz bázispáros létra, mPB, mPBmut, mPBdel, mPB-PGBD2 = *piggyBac* transzpozáz variánsok.

5.2. Kolónia esszék

A végbement transzpozíciót, valamint annak hatékonyságát kolónia esszével lehetett mérni.

A puromycinnel szelektált, megfestett, túlélő transzgenikus sejteket a gép segítségével lefotóztam és megszámláltam. Itt is az mPB szolgált pozitív, az mPBmut negatív kontrollként. Látható, hogy sem az NTDR deléciójával, sem az NTDR cseréjével, nem szűnt meg a transzpozíció. (7. ábra).



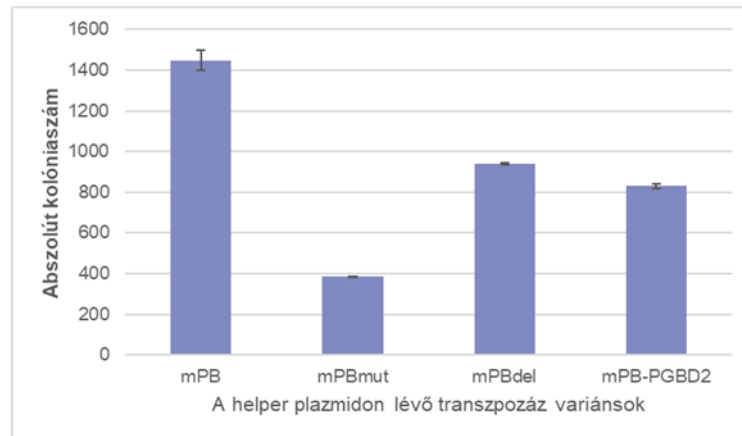
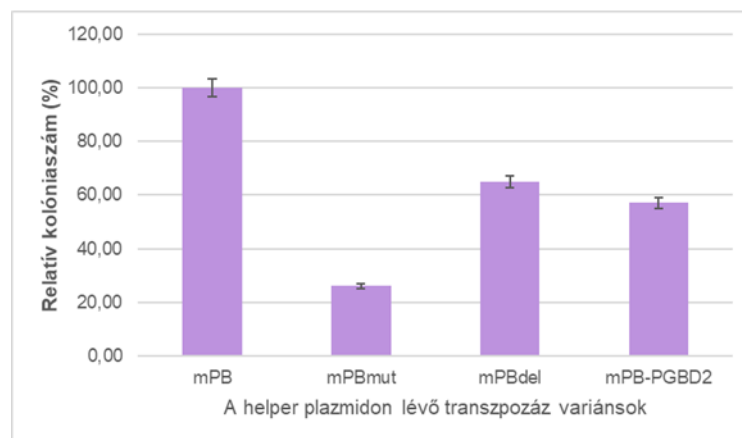
7. ábra: A kolónia esszék két biológiai párhuzamosának képei. Antibiotikus szelekciót túlélt, megfestett, HEK-293 sejttelepek láthatóak, amelyek számai alapján a *piggyBac* transzpozáz variánsok transzpozíciós aktivitására lehet következtetni.

Rövidítés: mPB, mPBmut, mPBdel, mPB-PGBD2 = *piggyBac* transzpozáz variánsok.

A megszámlált sejtkolóniák számait, egy összesített grafikonon ábrázoltam, és abszolút vagy relatív kolóniaszámokként adtam meg (8. ábra). A biológiai párhuzamosok ($n=2$) átlagolt értékei láthatóak, amelyek a relatív kolóniaszámok esetében az mPB+PB-GFP-Puro pozitív kontroll reakció 100%-ához lettek viszonyítva.

Fontos megjegyezni, hogy a negatív kontroll (mPBmut) soha nem éri el nulla értéket ($385 \text{ darab} \pm \text{SD} = 1,00$ vagy $26\% \pm \text{SD} = 0,89$). Ennek oka, hogy a puromycin rezisztencia gént tartalmazó plazmid random integrálódhat a sejtek genomjába, illetve a sejtvonalban mindig előfordulhat túlélési előnyt biztosító mutáció.

Ezzel a módszerrel kvantitatív módon is igazoltam, hogy a transzpozíció sem az mPBdel-nél, sem az mPB-PGBD2-es transzpozáznál nem tűnik el. Ugyanakkor a transzpozíciós hatékonyságuk az mPB transzpozázhoz képest látszólag alacsonyabb, de ennek megerősítéséhez további kutatások szükségesek.

A**B**

8. ábra: A kolónia essék kolóniaszámait ábrázoló grafikonok, az átlagolt és viszonyított értékek hibasávjai mindig a standard deviációt jelentik. A) Az abszolút kolóniaszámokat ábrázoló grafikon, ahol a biológiai párhuzamosok átlagolt kolóniaszámait olvashatók. B) A relatív kolóniaszámokat ábrázoló grafikon. Az értékek a mPB-hez, mint pozitív kontrollhoz lettek viszonyítva.

Rövidítések: mPB, mPBmut, mPBdel, mPB-PGBD2 = *piggyBac* transzpozáz variánsok.

6. DISZKUSSZIÓ

A rovar eredetű *piggyBac* transzpozáz fehérje N-terminális rendezetlen régiójának funkcionális vizsgálata kapcsán fény derült arra, hogy a PB transzpozáz az NTDR eltávolítása után is aktívan képes volt excízióra. Ebből az következik, hogy az NTDR nem esszenciális a transzpozáz excíziójához. A kolónia esszék vizsgálatával az is kimutatható volt, hogy az NTDR deléciós mutáns továbbra is képes az integrációra is, vagyis transzpozíciós képessége, még ha csökkent is, de megmaradt. Tehát sem az excíziós, sem az integrációs lépés nem szűnt meg, vagyis az NTDR jelentléte nem esszenciális a transzpozícióhoz.

Ezt az eredményt tovább erősíti az a tény, hogy ha az NTDR rendezetlen fehérjeszégmensében lévő aminosav sorrendet randomizálják, a transzpozíció szignifikánsan leromlik a pozitív kontrollhoz képest, de nem tűnik el teljesen [52]. Ennélfogva, az NTDR-nek nem csak a szekvenciája, hanem a fehérjeszégmens rendezetlensége is egyaránt fontos szerepet játszhat a transzpozíció szabályozásában, valószínűleg más molekulákkal való kölcsönhatás révén.

Kiemelendő, hogy a *piggyBac* excíziós és integrációs lépései kinetikailag jobban elkülönülnek, mint más DNS transzpozonoknál. Ezt korábbi kísérletek is igazolják, ahol a legnagyobb excíziós arányt a HEK-293 sejtvonal, míg a legnagyobb transzpozíciós rátát a HeLa sejtvonal esetében lehetett kimutatni [76]. Ez azt is jelenti, hogy a transzpozíciós hatékonyság nem becsülhető meg biztonsággal az excíziós hatékonyság alapján, emiatt is volt indokolt a transzpozáz variánsokat excíziós esszével és kolónia esszével egyaránt vizsgálni.

A dolgozatomban ismertetett eredményeim a korábbi megfigyelésekkel együtt közelebb vihetnek az NTDR szégmens funkciójának megértéséhez.

Az NTDR legvalószínűbb szerepe az, hogy a transzpozíció során részt vesz specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokban. A PB transzpozáz esetében eddig minimális számú, kísérletek alapján igazolt fehérjepartner mutattak ki, amely bizonyíthatja a gazdaspecifikusság hiányát, valamint azt, hogy az mPB transzpozon rendszer széles körben alkalmazható különböző organizmusokban [14].

Eredetileg más DNS transzpozázok analógiájára, az NTDR csak a TIR-ek kötésében kapott szerepet [37]. A későbbi kísérletek azonban felvetették, hogy esetlegesen kapcsolatban állhat a gazda DNS-javító faktoraival úgy, hogy gátolja a transzpozíció során keletkező kettős szálú törések által okozott genotoxikus hatásokat. Az NTDR segíthet abban is, hogy az

integráció sikeres legyen, még akkor is, ha nem pontos a cél DNS 'TTAA' szekvenciája, vagy ha DNS-túlnyúlás tapasztalható [77].

Lehetséges az is, hogy a transzpozáz ezen része kapcsolatban áll sejtciklust szabályozó fehérjékkel, ezáltal képes lehet a transzpozíció szabályozására a sejtciklus során. Ilyen kölcsönhatások már fontosnak bizonyultak más DNS transzpozázoknál, például a *Sleeping Beauty* transzpozáznál [78].

Ezenfelül, egy kutatócsoport nemrégiben felvetette, hogy az NTDR-ben található kazein kináz „regulációs” régióinak foszforilációja gátolja a transzpozíciót, esetleg a transzpozáz–DNS kölcsönhatások gátlása által [79]. Laborunk korábbi eredményei azonban ezt nem támasztották alá [52].

Érdekes módon korábban megállapították, hogy az embrionális őssejtekben magasabb a PB transzpozíciós hatékonysága; az őssejtek kedvezőbb környezetet jelentenek, így az NTDR-nek feltehetően szerepe van a transzpozíció ezen sejtekben megfigyelhető eltérő mértékéhez [52, 76].

Jövőbeli terveim fontos része így a konkrét interakciós partnerek azonosítása, a sejt-specifikusság mértékének feltérképezése, és az NTDR deléció hatásának vizsgálata az integrációs lépésre.

A vizsgálataim során világossá vált továbbá, hogy van kimutatható excízió és transzpozíció a PGBD2 NTDR szekvenciáját tartalmazó mutáns esetében, így megválaszolva kutatásomnak másik kérdéseit.

Jelentősége ennek abból fakad, hogy egy ugyanabba a szuperfamilia-ba tartozó, de „idegen” NTDR illesztése nem rontotta le teljesen a rovar eredetű *piggyBac* transzpozáz transzpozícióját. A PGBD2 jelenlegi, domesztikált funkciója lehetséges, hogy olyannyira eltér az eredetijétől, hogy egy aktív transzpozázra való illesztésnél sem szünteti meg transzpozíciót, ugyanakkor látszólag nem tudja komplementálni az aktív mPB transzpozáz mutációs fenotípusát. Ezek az információk nemcsak az NTDR funkciójának mélyebb megértéséhez járulnak hozzá, hanem segítenek a kevésbé ismert PGBD2 szerepének feltérképezésében is.

A domesztikált transzpozázok NTDR-jéről tudjuk, hogy a filogenetikai elemzések során nem lehet megbízhatóan a szuperfamilia más tagjaival azonosítani [28]. Ennek kapcsán kiderült, hogy az NTDR-nek a katalitikus doménhez viszonyított pozíciója jól konzervált, míg

a szekvenciája kevésbé. Ezek az észlelések arra utalnak, hogy az eredeti transzpozíciós mechanizmus mellett az NTDR fontos szerepet játszik a domesztikált fehérjék különféle endogén funkcióinak a regulálásában [52]. Ez egyezik a saját eredményeimből levont következtetéssel, miszerint a transzpozíciós folyamat működése révén az NTDR jelenlegi szerepe csak kis mértékben hasonlíthat az eredeti PB transzpozáz funkciójához.

Tovább erősíti ezt az érvet, hogy az úgynevezett PGBD1 funkciójának feltárásánál kiderült, hogy jelenlegi biológiai aktivitása alig hasonlít az ősi aktivitáshoz [38]. A többi PGBD-ben, a szelektív és erősen regulált expressziós mintázatok alapján, szintén arra lehet következtetni, hogy domesztikált funkciójuk nem társítható a kanonikus transzpozáz aktivitáshoz [41]. Hasonlóan érvényes lehet ez az NTDR régiójukra is.

Az utóbbi időben felmerült, hogy a transzpozáz C-terminálisán található ciszteinben gazdag domén sem esszenciális a PB transzpozíciójához [80]. Ez azonban biztos, hogy nem minden PB transzpozáz esetében igaz [49]. Érdekes módon a humán PGBD-k közül kettő (PGBD1, PGBD5) nem rendelkezik azonosítható CRD-vel, mégis minden jelenleg ismert PGBD tartalmaz erősen konzervált pozíciójú N-terminális rendezetlen domént [37]. Ennek alapján feltehető, hogy az NTDR régió funkcionálisan kulcsfontosságú lehet, de ennek igazolásához további kutatások szükségesek.

A funkció feltárása nemcsak a biológiai ismereteket bővítené, hanem fontos lenne az említett PB transzpozon-alapú génterápiák szempontjából is, hiszen célunk megérteni, hogy egy ilyen transzpozonrendszer hogyan lép kapcsolatba az emberi genommal és domesztikált elemeivel, és mennyire biztonságosan használható a jövőbeli génterápiás alkalmazásokban [41].

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS transzpozonok olyan mozgó elemek, amelyek képesek a genomban replikatív vagy nem-replikatív módon áthelyeződni. Bár korábban "parazita" DNS elemként voltak azonosítva, az elmúlt évtizedben számos kutatás kiderítette, hogy pozitív hatást is gyakorolhatnak a gazdagenom számára. Ráadásul, a molekuláris domesztikáció folyamata során gyakran funkcionális, endogén elemekké evolválódnak.

Kutatásom során célom volt a *piggyBac* DNS transzpozáz enzimének eddig ismeretlen funkciójú N-terminális rendezetlen doménjének (NTDR) a szerepét vizsgálni a transzpozícióban. Ezenkívül törekedtem a kevésbé kutatott, domesztikált *piggyBac* transzpozáz-eredetű elem, a PGBD2 tulajdonságainak alaposabb leírására is.

Az excíziós esszék és a kolónia esszék eredményei egyértelműen kimutatták, hogy az NTDR deléciója nem vezet a transzpozíció teljes megszűnéséhez. Ez azt sugallja, hogy az NTDR nem esszenciális a transzpozíció szempontjából. Kísérleteim során az is kiderült, hogy egy „idegen” PGBD2-es NTDR-re való cserélés során sem szűnik meg sem az excízió, sem a transzpozíció. Az eredményekből tehát az emelhető ki, hogy a domesztikált PGBD2-es NTDR jelenlegi funkciója csak kissé hasonlíthat az eredeti *piggyBac* transzpozáz NTDR szerepéhez.

Más vizsgáltok alapján feltételezhető, hogy az NTDR funkciója dinamikusan változott az evolúció során, és különböző környezeti és sejttípus-specifikus tényezők befolyásolhatják működését. Funkcióját tekintve valószínűsíthető, hogy elsősorban molekula kötéseket vesz részt, legyen az fehérje-fehérje kötés vagy esetleg fehérje-DNS kölcsönhatás.

Eredményeim további kutatásokra ösztönöznek annak megértése érdekében, hogy milyen interakciós partnerei lehetnek az NTDR-nek, milyen hatással van az integrációs lépésre és ezek által pontosan hogyan befolyásolja a transzpozáz működését.

Az NTDR szerepének felderítése új perspektívát nyújthat a transzpozáz működési mechanizmusának megértéséhez, és mivel a rovar eredetű *piggyBac* transzpozáz rendszer egy gyakran használt genetikai eszköz génbeviteli eljárásokban, hatékonyabbá és biztonságosabbá teheti a génterápiás alkalmazásokat.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet TIG* 5:103–107. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90039-5)
2. Ayarpadikannan S, Kim H-S (2014) The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. *Genomics Inform* 12:98–104. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.3.98>
3. Hsu P-S, Yu S-H, Tsai Y-T, Chang J-Y, Tsai L-K, Ye C-H, Song N-Y, Yau L-C, Lin S-P (2021) More than causing (epi)genomic instability: emerging physiological implications of transposable element modulation. *J Biomed Sci* 28:58. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00754-2>
4. Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128:1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
5. Gebrie A (2023) Transposable elements as essential elements in the control of gene expression. *Mob DNA* 14:9. <https://doi.org/10.1186/s13100-023-00297-3>
6. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C (2017) Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. *Nat Rev Genet* 18:71–86. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>
7. Chénais B (2013) Vectors for gene therapy: A place for DNA transposon. *Open J Genet* 3:1–11. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2013.32A1001>
8. Muñoz-López M, García-Pérez JL (2010) DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Curr Genomics* 11:115–128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
9. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
10. Hickman AB, Dyda F (2015) Mechanisms of DNA Transposition. *Microbiol Spectr* 3:10.1128/microbiolspec.mdna3-0034–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0034-2014>
11. McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci* 36:344–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
12. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1983. In: [NobelPrize.org](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1983/summary/). Accessed 19 Mar 2024
13. Aziz RK, Breitbart M, Edwards RA (2010) Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Res* 38:4207–4217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq140>
14. Chalopin D, Naville M, Plard F, Galiana D, Volff J-N (2015) Comparative Analysis of Transposable Elements Highlights Mobilome Diversity and Evolution in Vertebrates. *Genome Biol Evol* 7:567–580. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv005>

15. Stitzer MC, Anderson SN, Springer NM, Ross-Ibarra J (2021) The genomic ecosystem of transposable elements in maize. *PLoS Genet* 17:e1009768. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009768>
16. Canapa A, Barucca M, Biscotti MA, Forconi M, Olmo E (2016) Transposons, Genome Size, and Evolutionary Insights in Animals. *Cytogenet Genome Res* 147:217–239. <https://doi.org/10.1159/000444429>
17. de Koning APJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD (2011) Repetitive Elements May Comprise Over Two-Thirds of the Human Genome. *PLoS Genet* 7:e1002384. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002384>
18. Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, Wang H-G, Rosen E, Fraser MJ (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: Analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172:156–169. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90117-7)
19. Handler AM, McCombs SD, Fraser MJ, Saul SH (1998) The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7520–7525
20. Fraser MJ, Smith GE, Summers MD (1983) Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. *J Virol* 47:287–300. <https://doi.org/10.1128/JVI.47.2.287-300.1983>
21. Lobo N, Li X, Fraser MJ (1999) Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni*. *Mol Gen Genet MGG* 261:803–810. <https://doi.org/10.1007/s004380050024>
22. Handler AM, Harrell Ii RA (1999) Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* 8:449–457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.00139.x>
23. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997) Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells. *Cell* 91:501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
24. Yusa K (2015) piggyBac Transposon. *Microbiol Spectr* 3:10.1128/microbiolspec.mdna3-0028–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0028-2014>
25. Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T (2005) Efficient Transposition of the piggyBac (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice. *Cell* 122:473–483. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.013>
26. Mitra R, Fain-Thornton J, Craig NL (2008) piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J* 27:1097–1109. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.41>
27. Sinzelle L, Izsvák Z, Ivics Z (2009) Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci* 66:1073–1093. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8376-3>

28. Bouallègue M, Rouault J-D, Hua-Van A, Makni M, Capy P (2017) Molecular Evolution of piggyBac Superfamily: From Selfishness to Domestication. *Genome Biol Evol* 9:323–339. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw292>
29. Miller WJ, McDonald JF, Pinsky W (1997) Molecular domestication of mobile elements. In: Capy P (ed) *Evolution and Impact of Transposable Elements*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 261–270
30. Volff J-N (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays* 28:913–922. <https://doi.org/10.1002/bies.20452>
31. Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG (1998) Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394:744–751. <https://doi.org/10.1038/29457>
32. Mitra R, Li X, Kapusta A, Mayhew D, Mitra RD, Feschotte C, Craig NL (2013) Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:234–239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217548110>
33. Modzelewski AJ, Gan Chong J, Wang T, He L (2022) Mammalian genome innovation through transposon domestication. *Nat Cell Biol* 24:1332–1340. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00970-4>
34. Kapitonov VV, Jurka J (2005) RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3:e181. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030181>
35. Lloréns C, Marín I (2001) A Mammalian Gene Evolved from the Integrase Domain of an LTR Retrotransposon. *Mol Biol Evol* 18:1597–1600. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003947>
36. Riordan JD, Keng VW, Tschida BR, Scheetz TE, Bell JB, Podetz-Pedersen KM, Moser CD, Copeland NG, Jenkins NA, Roberts LR, Largaespada DA, Dupuy AJ (2013) Identification of Rtl1, a Retrotransposon-Derived Imprinted Gene, as a Novel Driver of Hepatocarcinogenesis. *PLOS Genet* 9:e1003441. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003441>
37. Sarkar A, Sim C, Hong YS, Hogan JR, Fraser MJ, Robertson HM, Collins FH (2003) Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related “domesticated” sequences. *Mol Genet Genomics* 270:173–180. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0909-0>
38. Raskó T, Pande A, Radschke K, Zink A, Singh M, Sommer C, Wachtl G, Kolacsek O, Inak G, Szvetnik A, Petrakis S, Bunse M, Bansal V, Selbach M, Orbán TI, Prigione A, Hurst LD, Izsvák Z (2022) A Novel Gene Controls a New Structure: PiggyBac Transposable Element-Derived 1, Unique to Mammals, Controls Mammal-Specific Neuronal Paraspeckles. *Mol Biol Evol* 39:msac175. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac175>

39. Damaj-Fourcade R, Meyer N, Obringer C, Le May N, Calmels N, Laugel V (2022) Statistical Approach of the Role of the Conserved CSB-PiggyBac Transposase Fusion Protein (CSB-PGBD3) in Genotype-Phenotype Correlation in Cockayne Syndrome Type B. *Front Genet* 13:. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.762047>
40. Beckermann TM, Luo W, Wilson CM, Veach RA, Wilson MH (2021) Cognate restriction of transposition by piggyBac-like proteins. *Nucleic Acids Res* 49:8135–8144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab578>
41. Kolacsek O, Wachtl G, Fóthi Á, Schamberger A, Sándor S, Pergel E, Varga N, Raskó T, Izsvák Z, Apáti Á, Orbán TI (2022) Functional indications for transposase domestications - Characterization of the human piggyBac transposase derived (PGBD) activities. *Gene* 834:146609. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146609>
42. Pace JK, Feschotte C (2007) The evolutionary history of human DNA transposons: Evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome Res* 17:422–432. <https://doi.org/10.1101/gr.5826307>
43. Henssen AG, Henaff E, Jiang E, Eisenberg AR, Carson JR, Villasante CM, Ray M, Still E, Burns M, Gandara J, Feschotte C, Mason CE, Kentsis A Genomic DNA transposition induced by human PGBD5. *eLife* 4:e10565. <https://doi.org/10.7554/eLife.10565>
44. Henssen AG, Koche R, Zhuang J, Jiang E, Reed C, Eisenberg A, Still E, MacArthur IC, Rodríguez-Fos E, Gonzalez S, Puiggròs M, Blackford AN, Mason CE, de Stanchina E, Gönen M, Emde A-K, Shah M, Arora K, Reeves C, Succi ND, Perlman E, Antonescu CR, Roberts CWM, Steen H, Mullen E, Jackson SP, Torrents D, Weng Z, Armstrong SA, Kentsis A (2017) PGBD5 promotes site-specific oncogenic mutations in human tumors. *Nat Genet* 49:1005–1014. <https://doi.org/10.1038/ng.3866>
45. Helou L, Beauclair L, Dardente H, Piégu B, Tsakou-Ngouafo L, Lecomte T, Kentsis A, Pontarotti P, Bigot Y (2021) The piggyBac-derived protein 5 (PGBD5) transposes both the closely and the distantly related piggyBac-like elements Tcr-pble and Ifp2. *J Mol Biol* 433:166839. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166839>
46. Zhu Q, High FA, Zhang C, Cerveira E, Russell MK, Longoni M, Joy MP, Ryan M, Milhomens A, Bellfy L, Coletti CM, Bhayani P, Hila R, Wilson JM, Donahoe PK, Lee C (2018) Systematic analysis of copy number variation associated with congenital diaphragmatic hernia. *Proc Natl Acad Sci* 115:5247–5252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714885115>
47. Zhang F, Mu G, Liu Z, Xie Q, Zhang H, Zhou S, Wang Z, Hu K, Wang Z, Zhao X, Cui Y, Xiang Q (2022) Genetic Polymorphisms Associated with Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Chinese Healthy Population. *Genes* 13:1867. <https://doi.org/10.3390/genes13101867>
48. Zhang S, Wang T, Wang H, Gao B, Sun C (2023) Identification of potential biomarkers of myopia based on machine learning algorithms. *BMC Ophthalmol* 23:388. <https://doi.org/10.1186/s12886-023-03119-5>
49. Chen Q, Luo W, Veach RA, Hickman AB, Wilson MH, Dyda F (2020) Structural basis of seamless excision and specific targeting by piggyBac transposase. *Nat Commun* 11:3446. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17128-1>

50. Keith JH, Fraser TS, Fraser MJ (2008) Analysis of the piggyBac transposase reveals a functional nuclear targeting signal in the 94 c-terminal residues. *BMC Mol Biol* 9:72. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-72>
51. Keith JH, Schaeper CA, Fraser TS, Fraser MJ (2008) Mutational analysis of highly conserved aspartate residues essential to the catalytic core of the piggyBac transposase. *BMC Mol Biol* 9:73. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-73>
52. Wachtl G, Schád É, Huszár K, Palazzo A, Ivics Z, Tantos Á, Orbán TI (2022) Functional Characterization of the N-Terminal Disordered Region of the piggyBac Transposase. *Int J Mol Sci* 23:10317. <https://doi.org/10.3390/ijms231810317>
53. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19:26–59. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00138-8)
54. C B, C von K, Fj S, Z L, B F, M S, F W, S K, G W, Da W (2004) Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 9:. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.10.013>
55. F M, Ka H (2007) Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 7:. <https://doi.org/10.2174/156652307782151425>
56. Mh W, Cj C, Al G (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 15:. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300028>
57. Li MA, Turner DJ, Ning Z, Yusa K, Liang Q, Eckert S, Rad L, Fitzgerald TW, Craig NL, Bradley A (2011) Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res* 39:e148. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr764>
58. Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL (2011) A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci* 108:1531–1536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008322108>
59. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung H-K, Nagy A (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07863>
60. Uddin F, Rudin CM, Sen T (2020) CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol* 10:1387. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
61. The Nobel Prize in Chemistry 2020. In: NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/popular-information/>. Accessed 24 Mar 2024
62. Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, Sternberg SH (2019) Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature* 571:219–225. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1323-z>

63. Eggenschwiler R, Gschwendtberger T, Felski C, Jahn C, Langer F, Sternecker J, Hermann A, Lüthmann J, Steinemann D, Haase A, Martin U, Petri S, Cantz T (2021) A selectable all-in-one CRISPR prime editing piggyBac transposon allows for highly efficient gene editing in human cell lines. *Sci Rep* 11:22154. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01689-2>
64. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R (2003) Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3:35–45. <https://doi.org/10.1038/nrc971>
65. Frey NV, Porter DL (2016) CAR T-cells merge into the fast lane of cancer care. *Am J Hematol* 91:146–150. <https://doi.org/10.1002/ajh.24238>
66. Research C for BE and (2024) Approved Cellular and Gene Therapy Products. FDA
67. Yagyu S, Nakazawa Y (2023) piggyBac-transposon-mediated CAR-T cells for the treatment of hematological and solid malignancies. *Int J Clin Oncol* 28:736–747. <https://doi.org/10.1007/s10147-023-02319-9>
68. Costello C, Derman BA, Kocoglu MH, Deol A, Ali AA, Gregory T, Dholaria B, Berdeja JG, Cohen AD, Patel KK, Siegel DS, Nath R, McArthur K, McCaigue J, Martin CE, Ghodduji M, Namini H, Ostertag EM, Spear MA, Belani R, Shah N (2021) Clinical Trials of BCMA-Targeted CAR-T Cells Utilizing a Novel Non-Viral Transposon System. *Blood* 138:3858. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-151672>
69. Costa LJ, Kumar SK, Atrash S, Liedtke M, Kaur G, Derman BA, Bergsagel PL, Mailankody S, McCarthy PL, Limones J, Chen Y, Das S, Thorpe J, Cacciatore J, Navarro G, Koegel AK, Burgess MR, Hege K, Richard S (2022) Results from the First Phase 1 Clinical Study of the B-Cell Maturation Antigen (BCMA) Nex T Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy CC-98633/BMS-986354 in Patients (pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *Blood* 140:1360–1362. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-160038>
70. Dholaria B, Kocoglu MH, Kin A, Asch AS, Ramakrishnan A, Bachier C, Rodriguez TE, Shune L, McArthur K, McCaigue J, DePrimo S, Martin C, Haag S, Zhang M, Namini H, Christie E, Belani R, Cranert SA, Coronella J, Shedlock DJ, Costello CL (2023) Early Safety Results of P-BCMA-ALLO1, a Fully Allogeneic Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T), in Patients with Relapsed / Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *Blood* 142:3479. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-182430>
71. Zhang Y, Zhang Z, Ding Y, Fang Y, Wang P, Chu W, Jin Z, Yang X, Wang J, Lou J, Qian Q (2021) Phase I clinical trial of EGFR-specific CAR-T cells generated by the piggyBac transposon system in advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 147:3725–3734. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03613-7>
72. Nishio N, Hanajiri R, Ishikawa Y, Murata M, Taniguchi R, Hamada M, Nishikawa E, Kawashima N, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y (2021) A Phase I Study of CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Generated By the PiggyBac Transposon Vector for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 138:3831. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-150469>

73. Tseng H, Zhang Y, Cranert SA, Richter M, Marquez K, Qiu J, Cho B, Tan Y, Tong M, Domingo C, Weiss L, Argus E, Sparks J, Ostertag EM, Coronella J, Shedlock DJ (2021) Memory Phenotype in Allogeneic Anti-BCMA CAR-T Cell Therapy (P-BCMA-ALLO1) Correlates with In Vivo Tumor Control. *Blood* 138:4802. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-154034>
74. Cadiñanos J, Bradley A (2007) Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system†. *Nucleic Acids Res* 35:e87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm446>
75. Elick TA, Bauser CA, Fraser MJ (1996) Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica* 98:33–41. <https://doi.org/10.1007/BF00120216>
76. Kolacsek O, Erdei Z, Apáti Á, Sándor S, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI (2014) Excision Efficiency Is Not Strongly Coupled to Transgenic Rate: Cell Type-Dependent Transposition Efficiency of Sleeping Beauty and piggyBac DNA Transposons. *Hum Gene Ther Methods* 25:241–252. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.149>
77. Li MA, Pettitt SJ, Eckert S, Ning Z, Rice S, Cadiñanos J, Yusa K, Conte N, Bradley A (2013) The piggyBac transposon displays local and distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. *Mol Cell Biol* 33:1317–1330. <https://doi.org/10.1128/MCB.00670-12>
78. Walisko O, Izsvák Z, Szabó K, Kaufman CD, Herold S, Ivics Z (2006) Sleeping Beauty transposase modulates cell-cycle progression through interaction with Miz-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4062–4067. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507683103>
79. Luo W, Hickman AB, Genzor P, Ghirlando R, Furman CM, Menshikh A, Haase A, Dyda F, Wilson MH (2022) Transposase N-terminal phosphorylation and asymmetric transposon ends inhibit piggyBac transposition in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 50:13128–13142. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1191>
80. Helou L, Beauclair L, Dardente H, Arensburger P, Buisine N, Jaszczyszyn Y, Guillou F, Lecomte T, Kentsis A, Bigot Y (2021) The C-terminal Domain of *piggyBac* Transposase Is Not Required for DNA Transposition. *J Mol Biol* 433:166805. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166805>

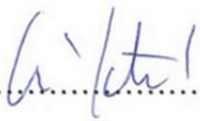
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Orbán Tamásnak, hogy lehetővé tette diplomamunkám elvégzését és szakmai útmutatásaival segítette szakdolgozatom elkészítését. Köszönet illeti Némethy Kornéliát, hogy segített engem a laboratóriumi módszerek elsajátításában. Köszönöm továbbá, belső konzulensemnek Dr. Szabó Krisztiánnak, hogy javaslataival segítette szakdolgozatom összeállítását.

Belső konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Szabó Krisztián, mint belső konzulens nyilatkozom, hogy Lávay Petra, BSc. III. évfolyamos hallgató „A DNS transzpozonok funkcionális vizsgálata emlős sejtekben” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, beadásra és védeésre alkalmasnak tartom. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött szakdolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2024. év.....04.....hó 26.....nap.

..........

belső konzulens

Témavezetői ellenjegyzés

Alulírott Dr. Orbán Tamás, mint témavezető nyilatkozom, hogy Lávay Petra, BSc. III. évfolyamos hallgató „A DNS transzpozonok funkcionális vizsgálata emlős sejtekben” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, beadásra és védeésre alkalmasnak tartom. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött szakdolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2024. április 26.



.....
témavezető